

Określenie granicy wykrywalności i oznaczalności metodą TLC z wykorzystaniem detekcji wzrokowej w świetle widzialnym i ultrafioletowym oraz detekcji densytometrycznej

Chromatografia obejmuje techniki oparte na podziale składników mieszaniny pomiędzy dwie nie mieszające się fazy, z których jedną jest faza nieruchomą (stacjonarną; w TLC jest to cienka warstwa adsorbentu umieszczona na nośniku), a druga jest fazą ruchomą (rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników). Rozdział składników mieszaniny jest zależny od ich powinowactwa do obu faz. Większe powinowactwo składników do fazy ruchomej powoduje ich szybsze przemieszczanie się na chromatogramie, w przeciwieństwie do składników o większym powinowactwie do fazy nieruchomej. Wielkością charakteryzującą przemieszczanie się badanej substancji jest współczynnik opóźnienia R_F .

Wykrywalność metody analitycznej określa najmniejsze stężenie graniczne lub ilość substancji, jaką można daną metodą wykryć.

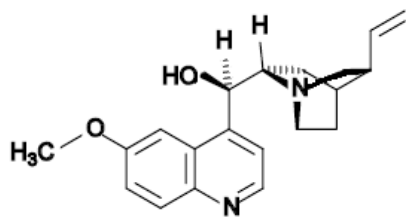
Oznaczalność metody analitycznej określa najmniejszą ilość substancji lub jej najmniejsze stężenie, jakie można oznaczyć ilościowo daną metodą.

Do wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności w metodach chromatograficznych wykorzystuje się stosunek sygnału analitycznego do poziomu zakłóceń (szumów) tła.

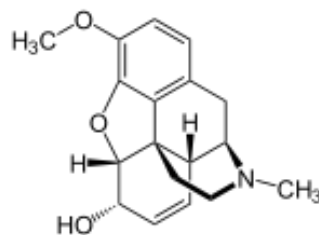
Za granicę wykrywalności (*limit of detection*, LOD) przyjmuje się takie stężenie (ilość) analitu, który daje wartość sygnału analitycznego ok. 2-3 razy większą od poziomu szumów.

Za granicę oznaczalności (*limit of quantitation*, LOQ) przyjmuje się takie minimalne stężenie (ilość) analitu, które daje sygnał, umożliwiający uzyskanie precyzyjnych i dokładnych wyników. Akceptowany jest sygnał ok. 10 razy większy od poziomu szumów.

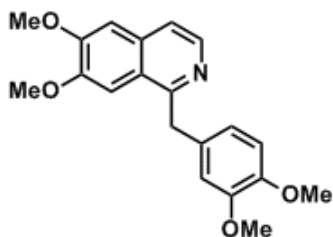
Granice wykrywalności i oznaczalności można wyznaczyć metodą wizualną lub instrumentalną.



Chinina



Kodeina



Papaweryna

Odczynniki:

Roztwory badane:

Chinina – 0,0020 % = µg/µL

Papaweryna – 0,0029 % = µg/µL

Kodeina – 0,0236 % = µg/µL

Faza nieruchoma: płytki aluminiowe pokryte żelazem krzemionkowym (Kieselgel 60) z czynnikiem fluoryzującym F₂₅₄

Faza ruchoma: octan etylu – metanol – amoniak 25% (25 : 3 : 1,5 v/v/v)

Układ wywołujący:

Odczynnik Dragendorffa :

A. 0,85 g zasadowego azotanu (V) bizmutu (III) rozpuścić w 10 ml lodowatego kwasu octowego i 40 ml wody

B. 8 g jodku potasu rozpuścić w 20 ml wody

Roztwór podstawowy : roztwory A i B zmieszane w stosunku 1 : 1

Roztwór dodatkowy : mieszanina 2 ml lodowatego kwasu octowego i 10 ml wody

Aparatura:

Lampa UV (254/366) firmy CAMAG

Densytopetr Scanner 3 firmy CAMAG

Wykonanie oznaczenia:

1. Na płytce o rozmiarach 10x10 cm nanieść za pomocą mikrostrzykawki roztwory badane w postaci pasm o szerokości 0,6 cm, w odległości 1 cm od dolnej krawędzi płytki (linia startu) i 1,1 cm od jej brzegów. Między brzegami nanoszonych pasm zachować 0,6 cm odstępy.

Badane roztwory nanieść w ilości:

chinina – 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL

papaweryna – 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL

kodeina – 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 μL

2. Po całkowitym wyschnięciu plamek, płytki umieścić w komorze chromatograficznej, nasyconej fazą ruchomą przez 15 minut. Chromatogramy rozwijać do momentu osiągnięcia przez fazę ruchomą odległości 8,5 cm od linii startu.
3. Płytki wysuszyć w temperaturze pokojowej.
4. Wysuszone płytki umieścić pod lampą UV i dokonać obserwacji przy długości fali $\lambda=254$ nm oraz 366 nm. Wyznaczyć granicę wykrywalności i oznaczalności dla roztworów badanych substancji.
5. Płytki zeskanować przy użyciu densytometru przy długości fali $\lambda=254$ nm i 366 nm. Na podstawie otrzymanych densytogramów, biorąc pod uwagę wysokość i pole powierzchni otrzymanych pików w stosunku do tła, wyznaczyć granicę wykrywalności i oznaczalności oznaczanych związków.
6. Wybarwić płytki za pomocą odczynnika Dragendorffa przygotowanego bezpośrednio przed użyciem przez zmieszanie *roztworu podstawowego* i *dotkowego* w proporcji **1:3**. Po wysuszeniu płytek wyznaczyć granicę wykrywalności i oznaczalności dla badanych substancji.
7. Wyniki umieścić w tabelkach.
8. Na podstawie otrzymanych wyników wyciągnąć wnioski, który sposób detekcji jest najbardziej czuły.